



Årsrapport 2015

Nye mikrobiologiske metoder

21. december 2015
Proj.nr. 2000207
Proj.nr. 2003854
SUM/JUSS

Sammendrag

I projektet "Nye mikrobiologiske metoder" sikres virksomhedernes adgang til den nyeste viden inden for mikrobiologiske analysemetoder til dokumentation af holdbarhed og fødevarer sikkerhed af fersk kød og kødprodukter samt til hygiejnekontrol af produktionsfaciliteter.

Overvågningen af markedet for nye, hurtige og omkostningseffektive analysemetoder har i 2015 medført, at otte nye og interessante metoder er indkøbt, afprøvet eller opdateret.

To hurtige PCR-metoder til Salmonella er blevet NordVal godkendt til Salmonella 12 metoden, og analysetiden kan dermed reduceres med yderligere 1½ time. Udstyr til fuldgenom sekventering er indkøbt med støtte fra Norma og Frode S. Jacobsens fond og er blevet anvendt i et udviklingsprojekt, så DMRI også fremadrettet kan være opdateret på de moderne og hurtige DNA-teknikker. Der er afprøvet et nyt system til fremstilling af fortyndingsrækker, som kan være velegnet til mindre forsøgsserier, idet fortyndingsrør fremstilles samtidig med fortyndingen af prøver. Der er deltaget i en række netværksmøder, NMKL, MIKRONET og EUROLAB, og afholdt en workshop om nye mikrobiologiske hurtigmetoder. På konference om antibiotikaresistens i husdyrbruget blev det vurderet, at den store stigning i positive besætninger med MRSA og ESBL inden for det sidste år, bl.a. kan skyldes den ændrede analysemetode.



Susanne Mansdal
Mikrobiologisk laboratorium

Indledning

Formål

Formålet med projektet "Nye mikrobiologiske metoder" er at sikre virksomhederne i svine-sektoren nem og hurtig adgang til den nyeste viden om mikrobiologiske problemstillinger og analysemetoder. Viden og overblik over de nyeste mikrobiologiske analysemetoder gør det muligt at vælge de bedste og mest omkostningseffektive løsninger og være på forkant med kunde- og myndighedskrav. Derved sikres den danske kødindustri mulighed for at bevare sit forspring i forhold til konkurrenterne. Nye relevante analysemetoder afprøves for at give bedst mulig sparring til svine-sektoren og for at sikre bedst egnede metoder til brug i projektarbejdet i DMRI's udviklingsprojekter.

Baggrund

Baggrunden for projektet er, at nye mikrobiologiske analysemetoder ofte er billigere, mere effektive og tidsbesparende, både hvad angår samlet analysetid og tidsforbrug til håndtering. Et hurtigere analysesvar kan give mulighed for at agere inden viderediskonering eller afsendelse af produktet og dermed forhindre tilbagekald. Udviklingen inden for sygdomsfremkaldende bakterier fortsætter og særlig relevant er patogene *E. coli* (VTEC), *Listeria monocytogenes* og resistente bakterier som MRSA og ESBL. Der er løbende rapporter om tilfælde af smittede mennesker fra fødevarer fx med *Listeria monocytogenes*, og der er derfor fortsat stort behov for nye og hurtigere analysemetoder til dokumentation af kvaliteten og sikkerheden af fødevarer. Hurtig smittesporing ved fund af patogene mikroorganismer er også vigtig og kan foretages med DMRI's beredskab af DNA-metoder. Laboratoriet er endvidere akkrediteret til en række mikrobiologiske standard analysemetoder, hvilket sikrer analyseresultaternes kvalitet og laboratoriets uvildighed.

Afprøvning og vurdering af nye mikrobiologiske analysemetoder

Nyheder inden for mikrobiologiske analysemetoder overvåges systematisk ved kontakt til leverandører og netværk samt abonnement på relevante nyhedsmedier og hjemmesider. Følgende metoder er afprøvet og vurderet:

Fuldgenom sekventering – WGS fra Illumina

Udstyr til fuldgenom sekventering (WGS) er indkøbt med støtte fra Norma og Frode S. Jacobsens Fond. Det drejer sig om Mi-Seq WGS fra Illumina. WGS forventes at blive udbredt til karakterisering af patogene bakterier generelt, og er anskaffet for, at

DMRI også fremadrettet kan beherske de moderne DNA-metoder. Udstyret er under indkøring i forskellige udviklingsprojekter og har været afprøvet til *Listeria monocytogenes* og kortlægning af baggrundsflora på udstyrsoverflader fra produktionsarealer. Prisen pr. prøve afhænger af, hvor mange prøver, der analyseres samtidig. Prisen for én chip til at analysere 15 prøver er ca. 10.000 kr. Den samlede materialepris vil være ca. 1.000 kr. pr. prøve under forudsætning af, at analysechippet fyldes helt op ved kørslen. Det tager omkring 2½ dage for en kørsel, og dertil kommer prøveforberedelse og resultatbehandling.

Bakteriofag hurtigmetode til Listeria spp. fra Sample6

Der er foretaget opdatering på en ny og hurtig listeriametode fra Sample6. Metoden er en opformeringsfri metode baseret på specifikke bakteriofager, som interagerer med *Listeria* i svaberprøver. Systemet virker ved at tilsætte bakteriofager til svaberprøven, inkubere kort ved 30°C, centrifugere og aflæse lysudvikling fra bioillumination i en reader. Den samlede håndtering af 20 svaberprøver frem til resultat angives til 7,5 time, med kun få minutters manuel håndtering. Resultatet aflæses automatisk og overføres elektronisk til software. Metoden er AOAC RI godkendt. Der er en endnu hurtigere listeriametode til svaberprøver på vej, samt tilsvarende hurtigmetoder til *Salmonella* og til fødevarerprøver. Desværre findes den nuværende listeriametode fra Sample6 kun til *Listeria spp.* og ikke specifikt til *L. monocytogenes*, som er mere relevant i Danmark.

StepOne/StepOnePlus og ARIA MX til Salmonella 12 metoden

Der er gennemført afprøvning af to nye hurtige PCR termocyclere, StepOne/StepOnePlus fra Applied Biosystems, og ARIA MX fra Agilent Technologies, der begge kan reducere analysetiden på *Salmonella* 12 metoden med ca. 1½ time. Der er opnået godkendelse fra NordVal på disse platforme, således at den hurtigere analyse kan anvendes i slagteriernes godkendte egenkontrol.

Petri film SEC til E. coli

Der er foretaget opdatering på Petrifilm Select EC til *E. coli*, til inkubering ved 42-44°C. Laboratoriet er akkrediteret til *E. coli* kimtal på Petrifilm EC fra 3M, til *E. coli* og coliforme bakterier, inkuberet ved 37°C. Ved en præstationsprøvning arrangeret af Livsmedelsverket fandt en stor del af deltagerne, der anvendte Petrifilm EC, ikke *E. coli* i en prøve tilsat en *E. coli*, der kun havde β-glucuronidase aktivitet ved 42-44°C. Det gjorde derimod de laboratorier, der anvendte Petrifilm SEC ved 42-44°C.

MRS aB agar til Mælkesyrebakterier

Der er foretaget en opdatering på kommercielt tilgængelige substrater til MRS aB agar til mælkesyrebakterier jf. NMKL nr.

140, 2. udgave 2007. Laboratoriet er akkrediteret til mælkesyre bakterier på MRS agar med pH 5,7 idet dette substrat er velegnet til analyse af kødprodukter. Den nyeste udgave af NMKL er beregnet til en bredere gruppe af fødevarer og ved anvendelse af MRS aB agar med pH 6,2, vil visse Carnobacterium-arter gro bedre. Mælkesyrebakterier er en meget inhomogen gruppe, med forskelligt optimum i vækstbetingelser, hvorfor det kan anbefales at anvende ikke-selektive medier som APT-agar parallelt med MRS aB agar. MRS aB agar indeholder amphotericin B, som hæmmer skimmelbaggrundsfloraen. Der planlægges en sammenligning af de to substrater til næste år. Ved en præstationsprøvning arrangeret af Livsmedelsverket, var der stor forskel på resultaterne for laboratorier, der havde anvendt disse to metoder.

INLABTEC til fortyndingsrækker

Der er afprøvet et nyt manuelt system, INLABTEC til fremstilling af fortyndingsrækker af mikrobiologiske prøver. Systemet er udviklet som alternativ til fremstilling af fortyndingsrør eller brug af færdigfremstillede fortyndingsrør. Systemet fremstiller fortyndingsrør i små plasticposer samtidig med, at prøven fortyndes. Det er vor erfaring, at systemet reducerer materialeforbrug og materialeomkostninger, men kræver en del manuel håndtering, og dermed er bedst egnet til mindre analyseserier.

RAPID' L. mono til Listeria monocytogenes

RAPID'L. mono er tidligere afprøvet i dette projekt, og en ny protokol med påvisning af *Listeria monocytogenes* på 24 timer inkl. opformering er indkørt på laboratoriet og anvendes nu i DMRI's udviklingsprojekter.

Mikrobiologisk metodeberedskab, netværk og konferencer

NordVal godkendelse af Salmonella 12 metoden

NordVal godkendelsen af Salmonella 12 real time PCR metode er fornyet og udvidet med to nye og hurtigere PCR-maskiner (se ovenfor). Analysetiden kan reduceres med 1½ time og er gældende til 1. juli 2017.

MIKRONET netværk om mikrobiologiske hurtigmetoder

Netværket for brugere af mikrobiologiske hurtigmetoder, opnåede støtte af GUDP i perioden juli 2013 til juni 2015. I netværket deltager repræsentanter fra kød-, mejeri- og fiskeindustrien. Der er afholdt netværksmøder hos Hilton Food, Arla Foods, DMRI, Danish Crown og KU, hvor netværket er blevet opdateret på mikrobiologiske hurtigmetoder. I år arrangerede DMRI endvidere en workshop for partnere i MIKRONET og inviterede deltagere fra den øvrige fødevarerindustri. Workshopen

blev afholdt på KU Science med fokus på prøveudtagning, analysemetoder til hygiejnekontrol og nye mikrobiologiske identifikationsmetoder:

- Prøveudtagning på produkter og udstyr – DMRI
- Analysemetoder til hygiejnekontrol – 3M
- Maldi-TOF til identifikation af mikroorganismer – bioMérieux
- Sekventering og identifikation af mikroorganismer – SSI
- Sequencing of bacteria and virus in “unknown” samples, principle and examples – KU Science

Som afslutning på dagen blev afholdt et netværksmøde i MI-KRONET netværket, hvor partnerne gav udtryk for tilfredshed med aktiviteterne i netværket, og deltagerne vil forsøge at holde kontakten og dele interessante nyheder om mikrobiologiske hurtigmetoder.

NMKL arbejdsgruppe

Der deltages løbende i NMKL møder, hvor det besluttes, hvilke nye NMKL metoder, der skal udarbejdes, og hvilke af de eksisterende metoder, der skal revideres. Der er generelt stor fokus på hurtigere mikrobiologiske analysemetoder. Vi deltager med en repræsentant i den mikrobiologiske komité. Her arbejdes på at udgive nye PCR baserede standardmetoder til bl.a. Yersinia, Shigella og VTEC, samt dyrkningsbaserede metoder til bl.a. *E. coli* O157, Salmonella på MSR/V og kimtal på blodagar. Årsmødet blev holdt i Danmark i år.

DANAK akkreditering og EUROLAB

Laboratoriets DANAK akkreditering er opretholdt. I EUROLAB bidrager DMRI til det internationale arbejde med bl.a. at opdatere ISO 17025 med generelle krav til prøvningslaboratorier, og er dermed med til at forbedre betingelserne for effektiv laboratoriedrift. Foruden de akkrediterede analysemetoder har laboratoriet et beredskab af specialanalyser, som ikke er akkrediterede. DMRI's kvalitetsstyringssystem er en del af Teknologisk Instituts fælles elektroniske akkrediteringssystem QA-web, som er blevet opdateret.

Studietur til Teknologisk Instituts mikrobiologiske laboratorium i Århus

For at sikre effektiv laboratoriedrift og få ny inspiration, er der gennemført studietur til Teknologisk Instituts mikrobiologiske laboratorium i Århus. Her blev udvekslet erfaringer og ideer til optimering af arbejdsgange. Især deres positive erfaring i Århus med inddragelse af en LEAN konsulent, der med nye øjne kunne se på optimering af arbejdsgange efter indflytning i nye lokaler, gjorde et stort indtryk.

Nordisk konference om antibiotikaresistens Der er deltaget i nordisk konference om antibiotikaresistens i husdyrbruget. Her var der speciel fokus på MRSA i svin og ESBL i kyllinger. De seneste år har vist en alarmerende stigning i positive besætninger i Danmark, men en stor del af stigningen kan tilskrives anvendelse af en ny analysemetode med en selektiv opformering i antibiotikaholdige substrater, i modsætning til tidligere, hvor der blev anvendt en påvisning af bakterierne og derefter en resistensbestemmelse. Det blev endvidere konkluderet, at de resistente bakterier, der isoleres fra patienter udgør én population, mens de resistente bakterier fra vores husdyr udgør en anden population.